



<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 5/10, 1/21, C12P 21/02, G01N 33/53 // C12P 21/08, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/31256</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月2日(02.06.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06449</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月18日(18.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/331727 1998年11月20日(20.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP) 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532-3 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 舟橋真一(FUNAHASHI, Shin-ichi)[JP/JP] 宮田昌二(MIYATA, Shoji)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p>	<p>野村信夫(NOMURA, Nobuo)[JP/JP] 長瀬隆弘(NAGASE, Takahiro)[JP/JP] 小原 収(OHARA, Osamu)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532-3 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所内 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: NOVEL GENE ENCODING BRAIN-SPECIFIC MEMBRANE PROTEIN</p> <p>(54) 発明の名称 脳特異的膜蛋白質をコードする新規遺伝子</p> <p>(57) Abstract A novel gene seemingly encoding a transmembrane glycoprotein which has been successfully isolated by constructing a cDNA library of 4 kb or above in size from mRNA expressed in human adult brain and analyzing the structures of cDNAs contained in the library by the shotgun method. This gene shows brain-specific expression and the protein encoded by the gene has a typical PDZ protein binding motif.</p>		

(57)要約

ヒト成人脳で発現している mRNA から 4kb 以上のサイズを有する cDNA のライブラリーを構築し、ショットガン法により該ライブラリーに含まれる cDNA の構造の解析を行った結果、膜貫通型の糖蛋白質をコードすると考えられる新規な遺伝子を単離することに成功した。該遺伝子は脳特異的な発現を示し、また、該遺伝子がコードする蛋白質は、典型的な PDZ 蛋白質の結合モチーフを有していた。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	セントクリストファー・ネイビス	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GDE	グレナダ	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ガンナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	IE	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CC	チェッコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

## 明細書

### 脳特異的膜蛋白質をコードする新規遺伝子

#### 技術分野

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造および用途に関する。

#### 背景技術

神経系では多様な細胞が存在し、これら細胞が神経ネットワークを形成し、高次脳機能を支えている。神経系の分化、発生、アポトーシスのメカニズムの解明は、神経系の機能あるいは神経関連疾患の発症機序の理解を助ける重要な研究課題であり、この分野においては精力的な研究が行なわれている。

最近、シナプス後膜の後膜肥厚（ポストシナプスデンシティー：PSD）において、受容体やイオンチャンネル分子が PSD95/SAP90 などの PDZ 蛋白質と複合体を形成し、シグナル伝達を行っていることが報告されるなど（Science 269, 1737-1740 (1995), Nature 378, 85-88 (1995), Neuron 17, 103-113 (1996), Neuron 17, 255-265 (1996), J. Neurosci. 16, 2157-2163 (1996), Nature 386, 223, 239 (1997), TIBS 21, 455-458 (1996)、J. Yanagisawa et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 7167-7172)、PDZ 蛋白質をはじめとした新規なシグナル伝達分子が次々と発見されている。

PDZ 蛋白質は細胞外からのシグナルを細胞内に伝達するための蛋白質複合体をコンパクトに形成させるためのモジュラー蛋白質としての役割を担っていると考えられており、神経系の複雑なシグナル伝達に重要な働きをしている。

一方、細胞膜上に存在する糖蛋白質は、このようなシグナルを受容するリセプターとしての機能していることが予想されおり、脳における情報伝達の解明

に向けて、このような膜蛋白質の単離、解析が望まれていた。

### 発明の開示

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造方法および用途を提供する。

本発明者らは、ヒト成人脳で発現している mRNA から 4kb 以上のサイズを有する cDNA のライブラリーを構築し、ショットガン法により該ライブラリーに含まれる cDNA の構造の解析を行った結果、「hh00149」と命名された新規な遺伝子を単離することに成功した。

該遺伝子がコードする蛋白質は、20 アミノ酸からなるシグナル配列および細胞膜を貫通する領域であると考えられる疎水性アミノ酸領域を有し、また、6 個のアスパラギン連結型の糖鎖付加部位を有することが推測され、膜貫通型の糖蛋白質であると考えられた。

ノーザンブロット解析の結果、hh00149 遺伝子は脳特異的な発現を示した。また、hh00149 蛋白質は、そのカルボキシ末端に「セリンスレオニン-バリリン」からなる典型的な PDZ 蛋白質の結合モチーフを有しており、その結合蛋白質として PDZ 蛋白質の存在が示唆された。PDZ 蛋白質に結合する蛋白質にはこれまでにイオンチャンネル、グルタミン酸レセプター、癌化関連遺伝子、細胞接着分子、膜結合のグアニレートキナーゼ、分化制御蛋白質など種々の蛋白質が知られており (Kornau, H.-C., et al. (1995) *Science* 269, 1737-1740, Kim, E. et al. (1995) *Nature* 378, 85-88, Matsumine et al. (1996) *Science* 272, 1020-1023, Axelrod, J.D., et al. (1996) *Science* 271, 1826-1832, J. Yanagisawa et al. *J. Biol. Chem.* 272, 7167-7172 (1997), H. Dong et al. (1997) *Nature* 386, 279-284)、これら蛋白質は種々のシグナル伝達経路に関与している。

このような遺伝子発現の組織特異性やその構造上の特徴から、hh00149 蛋白

質が神経細胞における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として機能することが示唆された。

本発明は、脳特異的に発現する新規な膜蛋白質、該蛋白質をコードする核酸分子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

1. 下記 (a) から (e) からなる群より選択される DNA、

(a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(e) (a) から (d) のいずれかに記載の DNA と他のペプチドまたはポリペプチドをコードする DNA とからなる、融合蛋白質をコードする DNA。

2. (1) に記載の DNA が挿入されたベクター、

3. (1) に記載の DNA または (2) に記載のベクターを保持する形質転換体、

4. (1) に記載の DNA によりコードされる蛋白質、

5. (3) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、(4) に記載の蛋白質の製造方法、

6. (4) に記載の蛋白質に結合する抗体、

7. (4) に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (4) に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および  
(b) (4) に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

8. (6) に記載の抗体と、(4) に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出または測定することを含んでなる、該蛋白質の検出または測定方法、

9. 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド、を提供するものである。

本発明者らにより単離された hh00149 cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、該 cDNA がコードする hh00149 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。

本発明の hh00149 蛋白質はアミノ末端の 20 アミノ酸にシグナル配列と考えられる疎水性アミノ酸の連なった領域が存在し、また C 末端側約 3 分の 2 の位置に膜貫通領域と予想される疎水性領域が存在しており（実施例 6、図 3）、細胞膜上に膜貫通型の蛋白質として存在していると考えられる。また、hh00149 遺伝子の転写産物は、脳特異的に検出された（実施例 5、図 2）。これら事実から、hh00149 蛋白質が、特に脳における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として機能していることが示唆される。従って、hh00149 蛋白質は、神経ペプチドを含む新規なシグナル伝達物質のスクリーニングに利用することができ、神経関連疾患の治療薬や診断薬の開発への利用が期待される。

本発明はまた、上記 hh00149 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を包含する。本発明において「機能的に同等」とは、蛋白質が、hh00149 蛋白質と同等の生物学的活性を有することを指す。2-ハイブリッドシステムを利用した結合タンパク質の解析から、hh00149 蛋白質が「149Y2H#151」蛋白質と結合することが示されている（特願平 10-331701 号）。従って、該生物学的活性としては、「149Y2H#151」蛋白質との結合活性が挙げられる。また、hh00149 蛋白質には

PDZ 蛋白質との結合配列が見出され、hh00149 蛋白質に結合する PDZ 蛋白質の存在が示唆された。従って、hh00149 蛋白質の生物学的活性としては、また、PDZ 蛋白質との結合活性も考えられる。蛋白質間の結合活性は、例えば、後述する免疫沈降法や酵母の 2-ハイブリッドシステムなどの解析手段を利用して検出することができる。

hh00149 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得るための方法としては、蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入する方法を用いることができる。例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法により、蛋白質中のアミノ酸配列に所望の変異を導入することができる(Kramer, W. and Fritz, H. J. *Methods in Enzymol.* (1987) 154, 350-367)。また、PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL 製) を使用して、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入することもできる。これらの方法により、hh00149 蛋白質 (配列番号: 2) において、その生物学的活性に影響を与えないよう、1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾された、hh00149 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることができる。また、タンパク質中のアミノ酸の変異は、自然界においても生じることがある。本発明には、このように人工的または自然にアミノ酸が変異した蛋白質も含まれる。

hh00149 蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が欠失したものの、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列に 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が付加したものの、配列番号: 2 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/

又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984)81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224,1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413 )。

hh00149 蛋白質に 1 又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、シグナルペプチドが除去された形態の hh00149 蛋白質が挙げられる。また、hh00149 蛋白質に 1 又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、hh00149 蛋白質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、hh00149 蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に包含される。融合蛋白質を作製する方法は、hh00149 蛋白質をコードする DNA と他のペプチド又は蛋白質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個の His (ヒスチジン) 残基からなる 6 × His、10 × His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒト c-myc の断片、VSV-GP の断片、p18HIV の断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また蛋白質としては、例えば GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。

本発明の蛋白質はまた、配列番号：1 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA によりコードされてお



り、かつ hh00149 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を含む。ストリンジントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジントな条件が挙げられる。低ストリンジントの条件とは、例えば 42°C、2×SSC、0.1% SDS が挙げられ、好ましくは 50°C、2XSSC、0.1% SDS である。またより好ましくは、高ストリンジントな条件が挙げられる。高ストリンジントな条件とは、例えば 65°C、2XSSC 及び 0.1% SDS が挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。

また、本発明には hh00149 蛋白質と機能的に同等であり、且つ該蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：2）と相同性を有する蛋白質も含まれる。相同性を有する蛋白質とは、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列と、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% 以上、アミノ酸配列上の相同性を有する蛋白質を意味する。蛋白質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明の蛋白質を製造するには、得られた DNA を発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、蛋白質を発現させる。

具体的には次のようにすればよい。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター/エンハンサー、本発明の蛋白質をコードする DNA、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させた DNA あるいはそれを含むベクターを構築する。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulligan らの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZ プロモーター、araB プロモーターを挙げることができる。lacZ プロモーターを使用する場合、Ward らの方法 (Nature (1998) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araB プロモーターを使用する場合、Better らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明の蛋白質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えば pEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えば、pBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えば pMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えば pHSV、pMV、pAdexLcw、レトロウイルス由来の発現ベクター。例えば pZlpneo、酵母由来の発現ベクター、例えば pNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えば pPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えば pQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2 が挙げられる。

上述のように構築された本発明の発現ベクターの宿主への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology(1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、

例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は約 6~8 であるのが好ましい。培養は通常約 30~40°C で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とするDNAをヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤ

ギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702 )。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る (Susumu, M. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594 )。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の蛋白質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。

これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

本発明はまた、hh00149 蛋白質（配列番号：2）の部分ペプチドを含む。部分ペプチドとしては、例えば、hh00149 遺伝子がコードする部分ペプチド配列のうち、他の蛋白質、例えば、149Y2H#151 蛋白質や PDZ 蛋白質との結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、hh00149 蛋白質を介したシグナル伝達の阻害などに利用し得る。

本発明の蛋白質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードする DNA に関する。本発明の DNA は、上述したような本発明の蛋白質の生産に利用される他、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患の遺伝子治療などへ応用することも考えられる。

本発明の蛋白質をコードする cDNA は、例えば、本明細書に記載のプロープを用いヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングして得ることができる。

得られた cDNA 又は cDNA 断片をプローブとして、さらに cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより異なる細胞、組織、臓器又は種から cDNA を得ることができる。cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてジェノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ジェノミックDNAを単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製)およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932)に従い、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーショ

ン法により確認すればよい。

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。また、本発明のDNAを市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び/又は終始コドン (TAA、TGA 又は TAG) の挿入等が挙げられる。

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：2記載のアミノ酸配列からなる蛋白質や上記したその変異体をコードするDNAを包含する。好ましくは、配列番号：1の塩基配列において466位の塩基Aから2832位の塩基Cからなる塩基配列を含むDNAである。

本発明のDNAはまた、配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを含む。

ストリンジентな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば、低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентの条件とは、例えば42°C、2xSSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50°C、2xSSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジентな条件が挙げられる。高ストリンジентな条件とは、例えば65°C、2xSSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは、cDNAまたは染色体DNAである。

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合



物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、精製した蛋白質やその部分ペプチドであっても、細胞表面に発現させた形態、膜画分としての形態であってもよい。

また、本発明のスクリーニング方法で使用される被験試料としては、例えばペプチド、精製若しくは粗精製蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液、海洋生物抽出液、植物抽出液が挙げられる。被験試料は、天然由来であっても、人工的に合成されたものであってもよい。

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明の蛋白質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のプロモーターの下流に挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1  $\alpha$  promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR  $\alpha$  promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326

(1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAE デキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるがいずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ) を本発明の蛋白質の N 末または C 末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合蛋白質として本発明の蛋白質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる (実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質 (GFP) などとの融合蛋白質を発現することができるベクターが市販されている。

融合蛋白質にすることにより本発明の蛋白質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合蛋白質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒト c-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖蛋白質 (VSV-GP)、T7 gene10 蛋白質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質 (HSV-tag)、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明の蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる (実験医学 13, 85-90 (1995))。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明の蛋白質、それと結合能を有する蛋白質、および抗体からなる。上記

エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明の蛋白質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明の蛋白質に対する抗体は、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させた蛋白質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明の蛋白質を、例えば、GST などのエピトープとの融合蛋白質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4B などのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明の蛋白質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D.: *Antibodies*, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降された蛋白質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることで蛋白質の分子量により結合していた蛋白質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明の蛋白質に結合した蛋白質は、クマシー染色や銀染色といった蛋白質の通常染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である  $^{35}\text{S}$ -メチオニンや  $^{35}\text{S}$ -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内の蛋白質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。蛋白質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的の蛋白質を精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-

ハイブリッドシステム(Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行う方法が挙げられる。

本発明の蛋白質とヘテロダイマーからなる転写調節因子の一方のサブユニットとの融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクター及び被験試料として所望のcDNAとヘテロダイマーからなる転写調節因子のもう一方のサブユニットをコードするDNAとを連結してなるDNAを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質にcDNAがコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するような 2-ハイブリッドシステムを用いることができる。または、酵母 GAL4 蛋白質のように DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインを有する転写調節因子の各ドメインを分断して、転写調節因子の DNA 結合ドメインと本発明の蛋白質からなる融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクター及び被験試料としての所望のcDNAと転写調節因子転写活性化ドメインをコードするDNAとを連結してなるDNAを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質にcDNAがコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するような 2-ハイブリッドシステムを用いることができる。本発明の蛋白質に結合する蛋白質が存在した場合、レポーター遺伝子の発現量を検出又は測定することにより蛋白質を選択することができる。

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNAと LexA のDNA結合ドメインをコードする遺伝子とをフレームが一致するように連結し、発現ベクターを作製する。次に、所望のcDNAと GAL4 転写活性化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製する。

LexA 結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節される HIS3 遺伝子を組み込んだ細胞を上記の 2-ハイブリッドシステム発現プラスミドを用

を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

本発明の蛋白質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。すなわち、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被験試料を適用する。被験試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合する蛋白質を得ることができる。

上記のスクリーニング方法によって単離される化合物は、本発明の蛋白質の機能異常などに起因する疾患において、本発明の蛋白質の活性を促進又は阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明の蛋白質と結合活性を有する物質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、シヨ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、1日あたり約 0.1 から 100mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg である。

非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg とし

いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートすると蛋白質の相互作用が認められたときのみ細胞の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができる。レポーター遺伝子としては、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子等を用いることができる。

2-ハイブリッドシステムは、通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販の 2-ハイブリッドシステムのキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれも CLONTECH 製)、HybriZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene 製) が挙げられる。

実際に、酵母の 2-ハイブリッドシステムを用いて APC と hDLG の結合 (A. Matsumine et al. Science 272, 1020-1023 (1996)); GRIP と AMPA レセプターの結合 (H. Dong et al. Nature 386, 279-284 (1997)); Homer とグルタミン酸レセプター (P. R. Brakeman et al. Nature 386, 284-288 (1997)); SRY と SIP-1 の結合 (F. Poulat et al. J. Biol. Chem. 272, 7167-7172 (1997))などの PDZ ドメインを有するイオンチャンネルやシグナル伝達に関与するリセプター蛋白質の相互作用が証明されている。

また、本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニングは、ウエストウエスタンプロッキング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うこともできる。すなわち、本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していると予想される細胞、組織、臓器より cDNA を単離し、これをファージベクター、例えば  $\lambda$ gt11、ZAPII 等へ導入して cDNA ライブラリーを作製し、これを培地を引いたプレート上で発現させ、フィルターに発現させた蛋白質を固定し、標識して精製した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するプラークを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性

て)においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明の抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

本発明の蛋白質に対して特異的に結合する抗体は、蛋白質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、本発明の蛋白質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、本明細書に記載された全ての蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を使用できる。また、蛋白質の部分ペプチドも用いることができる。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質のアミノ基(N)末端断片やカルボキシ(C)末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に特異的に反応する抗体を意味する。

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得、この蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。



感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞と

しては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば EB ウィルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* で蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば、U266 と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭 63-17688 号公報）。

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735 および W096-34096 参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて

產生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 又は H鎖と L鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによつて得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来の CDR (相補性決定領域) とヒト抗体由来の FR (フレームワーク領域) 及び定常領域からな

るヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等により行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia 製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明は、配列番号：1に示される塩基配列からなるDNAまたは該DNAと相補的なDNAとハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチドを包含する。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNA又

は該DNAと相補的なDNAと選択的にハイブリダイズし得るプローブ、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が含まれる。

本発明は、例えば、配列番号：1に示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1に示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

選択的に安定にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなポリヌクレオチドとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載

したものを使用すればよい。このようなポリヌクレオチドは、後述の実施例に記載するように本発明の蛋白質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1～100mg/kg、好ましくは0.1～50mg/kgの範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、したがって本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

### 図面の簡単な説明

図1は、hh00149 遺伝子のノーザンブロット解析の結果を示す写真である。図中の「H」は Human MTN Blot (CLONTECH 社製 カタログ番号 7760-1)を用いて検出したもので、1.心臓、2.脳、3.胎盤、4.肺、5.肝臓、6.骨格筋、7.腎臓、8.すい臓を示す。「H4」は Human MTN Blot IV (CLONTECH 社製 カタログ番号 7766-1)を用いて検出したもので、1.脾臓、2.胸腺、3.前立腺、4.精巣、5.子宮、6.小腸、7.大腸、8.末梢リンパ球を示す。「F」は Human Fetal MTN Blot II (CLONTECH 社製 カタログ番号 7756-1)を用いて検出したもので、1.胎児脳、2.胎児肺、3.胎児肝臓、4.胎児腎臓を示す。「C」は Human Cancer Cell Line MTN Blot II (CLONTECH 社製 カタログ番号 7757-1)を用いて検出したもので、1.急性白血病 HL-60 細胞、2.HeLa 細胞 S3、3.慢性骨髄性白血病 K-562、4.リンパ芽球性白血病 MOLT-4 細胞、5.バーキットリンフォーマ Raji 細胞、6.大腸腺癌 SW-480 細胞、7.肺癌 A549 細胞、8.黒色腫 G361 細胞をそれぞれ示す。「B2」は Human Brain MTN Blot II (CLONTECH 社製 カタログ番号 7755-1)を用いて検出したもので、1.小脳、2.大脳皮質、3.延髄、4.脊髄、5.後頭葉、6.前頭葉、7.側頭葉、8.被殻をそれぞれ示す。「B4」は Human Brain MTN Blot IV (CLONTECH 社製 カタログ番号 7769-1)を用いて検出したもので、1.小脳扁桃、2.尾状核、3.脳梁、4.海馬、5.全脳、6.黒質、7.視床を示す。

図2は、RT-PCR の結果を示す写真である。使用した第1鎖 cDNA は 1.脳、2.心臓、3.腎臓、4.肝臓、5.肺、6.すい臓、7.胎盤、8.骨格筋、9.大腸、10.卵巣、11.末梢リンパ球、12.前立腺、13.小腸、14.脾臓、15.精巣、16.胸腺、17.胎児脳、18.胎児心臓、19.胎児腎臓、20.胎児肝臓、21.胎児肺、22.胎児骨格筋、23.胎児脾臓、24.胎児胸腺、25.Breast carcinoma (GI-101)、26.Lung carcinoma(LX-1)、27.Colon adenocarcinoma (CX-1)、28.Lung carcinoma (GI-117)、29.Prostatic adenocarcinoma (PC-3)、30.Colon adenocarcinoma

(GI-112)、31.Ovarian carcinoma (GI-102)、32.Pancreatic adenocarcinoma (GI-103) (CLONTECH 社製 カタログ番号 K1420-1, K1421-1, K1425-1, K1422-1)の 32 種類である。上段は hh00149 遺伝子を、下段は G3PDH 遺伝子(対照)を検出するプライマーを用いた RT-PCR の結果である。

図 3 は、hh00149 蛋白質の構造の予測を示す図である。図中ひし形のマークは疎水性領域を示し、楕円形のマークは親水性領域を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] サイズにより分画したヒト脳 cDNA ライブラリーの構築  
cDNA の構築は、小原らの DNA Research 4, 53-59 (1997)に記載の方法にしたがった。具体的には、2 重鎖 cDNA は Human poly A + RNA whole brain (CLONTECH 社製 カタログ番号 6516-1)を用い、逆転写酵素 SuperScript II (GibcoBRL カタログ番号 18064-014)を 5' 端に Not I サイトを有する(dT)15 プライマー (GACTAGTTCT AGATCGCGAG CGGCCGCCCT TTTTTTTTTT TTTT/配列番号：3)によりマニュアルに従いおこなった。得られた cDNA は制限酵素 Not I による消化につづいて Sal I アダプターを連結させた。用いた Sal I アダプターを表 1 に示す。

表 1

5'-TCGACCCACGCGTCCG-3'	(配列番号：4)
3'-GGGTGCGCAGGC <sub>p</sub> -5'	(配列番号：5)

1%低融点アガロースゲルの電気泳動により 3kb よりも短い cDNA を除き、3kb よりもサイズの大きい cDNA 断片を Not I、Sal I によって消化した pBluescript



II SK+ (STRATAGENE 社製 カタログ番号 212205)と連結反応を行ない、ElectroMax DH10B™ cells (GibcoBRL 社製 カタログ番号 18290-015)へマニュアルに従いエレクトロポレーションにより導入した。アガープレート上でアンピシリン耐性のコロニーとして得られた独立した 8 百万のコロニーより標準的なアルカリ/SDS による溶解法によりプラスミド DNA を抽出した。得られたプラスミド DNA は大部分は closed circular DNA なので電気泳動によって分離されるサイズは挿入されている cDNA のサイズを反映している。したがって、1% アガロースゲルで 10 個の分画に分けたものは cDNA のサイズによって分けられたものに相当する。各々の分画は再び大腸菌に導入し、各分画あたり百万以上のコロニーからプラスミドを抽出した。ただし、形質転換した大腸菌は 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンの入った LB 液体培地で 3 時間振とう培養した。抽出したプラスミドは電気泳動してそのサイズを確認し、同様の選択方法を挿入された cDNA のサイズが 8kb 以下のものについては少なくとも 2 回、8kb 以上の cDNA インサートについては 3 回のサイズを選択を繰り返し、サイズにより分画した cDNA ライブラリーを構築した。

#### [実施例 2] hh00149 遺伝子のクローニング

上述の分画された cDNA ライブラリーよりプラスミド DNA を抽出して塩基配列を決定した。プラスミド DNA は Kurabo 社の PI-100 自動プラスミド DNA 抽出装置を使用して抽出した。ダイープライマーサイクルシーケンシングの反応は ABI PRISM™ サイクルシーケンシングキット (Perkin-Elmer 社製)を使用して CATALYST Turbo (Perkin-Elmer 社製)により自動で行なわせた。反応産物は ABI373A または ABI377 DNA シーケンサーにより泳動を行ない、ABI sequence analysis system, INHERIT により解析した。インサート cDNA の両端からのシーケンシングには Dye-labeled M13 forward primer (Perkin-Elmer 社製) と reverse primer (Perkin-Elmer 社製) を用いた。さらに cDNA 全体の塩基配列の決定にはショットガン法を用いた。その 1 クローンとして hh00149

遺伝子の配列が決定された。hh00149 の塩基配列および予想されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1 および 2 に示す。

[実施例 3] 染色体のマッピング

リサーチジェネティクス社 (Research Genetics, Inc.) の Gene Bridge 4 Radiation Hybrid Panel を用いて hh00149 遺伝子の染色体上の位置をマッピングした。2 $\mu$ l の 10 $\times$ KOD dash バッファー、1.6 $\mu$ l の 2.5mM dNTP、0.8 $\mu$ l の 10 $\mu$ M プライマー 149-2867 (CAGGGTGGGA GAAGGGGAAA GAATC/配列番号：6)、0.8 $\mu$ l の 10 $\mu$ M プライマー 149-2944 (GAGGCCATTG ACAGGGAGAC GAAAC/配列番号：7)、13.4 $\mu$ l の滅菌水、0.4 $\mu$ l の KOD dash DNA ポリメラーゼ (TOYOBO #LDP-101) を混合し、94 $^{\circ}$ C5 分の保温の後、98 $^{\circ}$ C10 秒、60 $^{\circ}$ C2 秒、74 $^{\circ}$ C10 秒の 3 ステップを 40 回繰り返した polymerase chain reaction (PCR) を行い、遺伝子の増幅を行った。その結果の解析については World Wide Web (<http://www.sph.umich.edu/group/statgen/software>) よりダウンロードした解析ソフトを使用した。その結果、染色体 6 番のマーカー WI-4142 から 3.2cR に hh00149 遺伝子はマップされた。

[実施例 4] ノーザンブロットによる hh00149 遺伝子発現の組織特異性解析

ノーザンブロットは常法に従い、CLONTECH 社の MTN Blot (カタログ番号 7760-1, 7766-1, 7756-1, 7757-1, 7755-1, 7769-1) を用いて、25ng の Nco I 断片 (配列番号：1 の 948 から 1574 に相当) をアマーシャム Megaprime DNA labelling kit (カタログ No. RPN1607) で [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP によりラベルし、プローブとして用いた。ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech 社製 カタログ No. 8015-2) 20ml にて 68 $^{\circ}$ C30 分間プレハイブリダイゼーションを行い、 $2 \times 10^7$  cpm のラベルされたプローブを同じく ExpressHyb Hybridization Solution 20ml ( $1 \times 10^6$  cpm / ml) にて 68 $^{\circ}$ C1 時間ハイブリダイズさせた。2 $\times$ SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム (pH7.0)) / 0.05% SDS を用いて室温で 10 分 3 回フィルターを洗い、さらに 0.1 $\times$ SSC / 0.1% SDS にて 50 $^{\circ}$ C で 15

分2回洗った後、FUJI Imaging plate (Fuji film 社製) にて1晩感光させ、FUJI BAS2000 (Fuji film 社製) にて解析した。その結果、脳特異的に 3.2kb の転写物が検出され、Human Brain MTN Blot II(カタログ番号 7755-1)、 Human Brain MTN Blot IV (カタログ番号 7769-1)を用いた解析の結果、大脳皮質、後頭葉、前頭葉、側頭葉において高い発現がみられ、小脳、被殻、小脳扁桃においても発現が見られた。また、脳以外では脾臓、精巣、肺がん細胞 A549 において発現が確認された (図1)。

[実施例5] RT-PCRによる hh00149 遺伝子発現の組織特異性解析

RT-PCRにより、これまでにノーザンブロットで解析した組織を含む32種類の組織についての mRNA の発現量の比較を行い、hh00149 遺伝子の発現の組織特異性を解析した。cDNA は CLONTECH 社より市販されている Human MTC Panel I(K1402-1)、Human MTC Panel II (K1421-1)、Human Fetal MTC Panel I(K1425-1)、Human Tumor MTC Panel(K1422-1)を用いた。2 $\mu$ l の 10 $\times$ KOD dash バッファー、1.6 $\mu$ l の 2.5mM dNTP、0.8 $\mu$ l の 10 $\mu$ M プライマー 149-2867 (CAGGGTGGGA GAAGGGGAAA GAATC/配列番号: 6)、0.8 $\mu$ l の 10 $\mu$ M プライマー 149-2944 (GAGGCCATTG ACAGGGAGAC GAAAC/配列番号: 7)、13.4 $\mu$ l の滅菌水、0.4 $\mu$ l の KOD dash DNA ポリメラーゼ (TOYOBO #LDP-101) を混合し、94 $^{\circ}$ C5分の保温の後、98 $^{\circ}$ C10秒、60 $^{\circ}$ C2秒、74 $^{\circ}$ C10秒の3ステップを30回繰り返した。図2にその結果を示す。脳及びに胎児脳においてかなり高い発現が見られた。また、精巣、脾臓、卵巣においても発現がみられたが他の組織においては発現は見られなかった。

[実施例6] hh00149 蛋白質の構造の予測

GCG Sequence Analysis Software Package (Genetic Computer Group, Oxford Molecular Group, Inc.) の「peptide structure」および「pepplot」を使用して hh00149 蛋白質の構造を予測した(図3)。その結果、アミノ末端 (1-20) および 527 から 557 位のアミノ酸が疎水性に富み、前者はシグナル配列として後

者は膜貫通領域として機能していることが推測された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の膜白質は、脳における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として機能していることが示唆されるため、本発明の膜蛋白質やその遺伝子は神経ペプチドを含む新規なシグナル伝達物質のスクリーニングへの利用が期待される。また、本発明の膜白質やその遺伝子は神経関連疾患の新たな治療薬や診断薬の開発への応用が期待される。

## 請求の範囲

1. 下記 (a) から (e) からなる群より選択される DNA。

(a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(e) (a) から (d) のいずれかに記載の DNA と他のペプチドまたはポリペプチドをコードする DNA とからなる、融合蛋白質をコードする DNA。

2. 請求項 1 に記載の DNA が挿入されたベクター。

3. 請求項 1 に記載の DNA または請求項 2 に記載のベクターを保持する形質転換体。

4. 請求項 1 に記載の DNA によりコードされる蛋白質。

5. 請求項 3 に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、請求項 4 に記載の蛋白質の製造方法。

6. 請求項 4 に記載の蛋白質に結合する抗体。

7. 請求項 4 に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

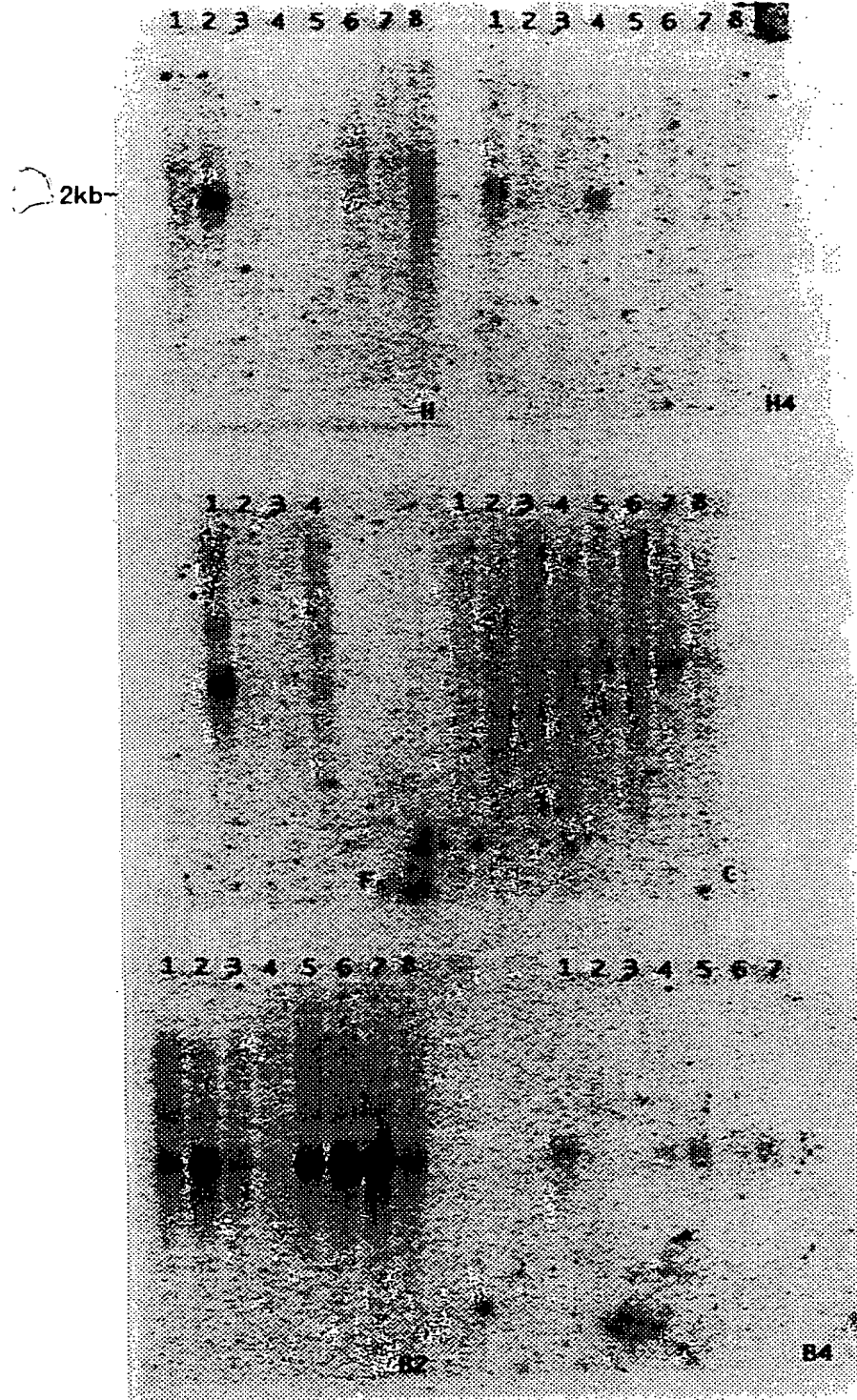
(a) 請求項 4 に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b)請求項4に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

8. 請求項6に記載の抗体と、請求項4に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出または測定することを含んでなる、該蛋白質の検出または測定方法。

9. 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド。

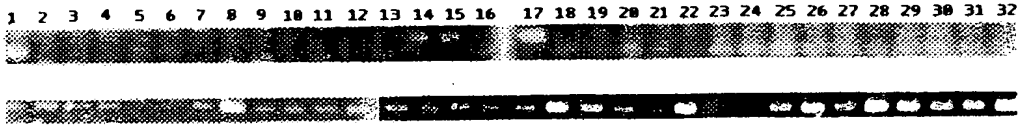
☒ 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

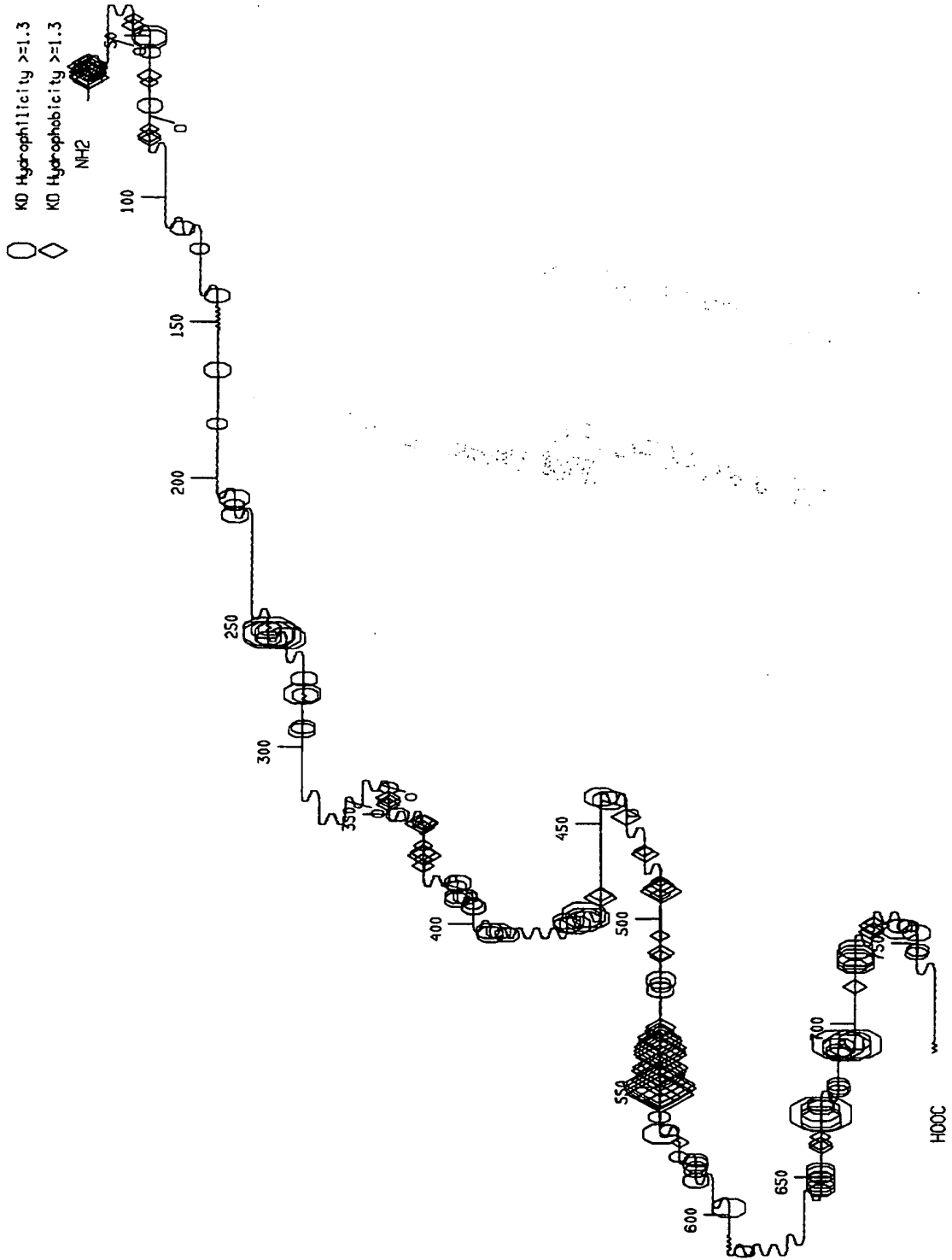


☒ 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

Kazusa DNA Research Institute

<120> Genes encoding brain-specific membrane proteins

<130> C2-010PCT

<150> JP 1998-331727

<151> 1998-11-20

<160> 7

<210> 1

<211> 3144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (466)..(2832)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<400> 1

gcctggctcc ctctcgctga gacacacata cactcacaca tacacaacce ggcaggctcg 60

tctgaacttg aagacacccc acattccaag atgcccgagg ttcttgggaa tgcctgggggt 120

tcttgatecc ggaaaatcct accggcatcc tcctagggag ggattattat tattatTTTT 180

ctttaatctg gaagagaaga gaacaagttg tgcttttccc cccttcttct tgctaaacgc 240

catggatata actgaataag cggctcaggg ctttccccgc gtggacgtcc gaggccacca 300

tctgcctgca ttcgccggag ccgccggagg gtttagctcg agtctgtctc gggcggggaa 360

ggatgcgtgg ccgagccggg gagccccggc gccccgcgga gccggcctcg gtgccacca 420

gccgggggta gatgctgcct cgccccaggcg ctgagtgacc agacc atg gag acc ctg 477

Met Glu Thr Leu

1

ctt ggt ggc ctg cta gcg ttt ggc atg gcg ttt gcc gtg gtc gac gcc 525

Leu Gly Gly Leu Leu Ala Phe Gly Met Ala Phe Ala Val Val Asp Ala

5

10

15

20

tgc ccc aag tac tgt gtc tgc cag aat ctg tct gag tca ctg ggg acc 573

Cys Pro Lys Tyr Cys Val Cys Gln Asn Leu Ser Glu Ser Leu Gly Thr

25

30

35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



ctg tgc ccc tcc aag ggg ctg ctc ttt gta ccc cct gat att gac cgg 621  
 Leu Cys Pro Ser Lys Gly Leu Leu Phe Val Pro Pro Asp Ile Asp Arg  
                   40                                  45                                  50

cgg aca gtg gag ctg cgc ctg ggc ggc aac ttc atc atc cac atc agc 669  
 Arg Thr Val Glu Leu Arg Leu Gly Gly Asn Phe Ile Ile His Ile Ser  
                   55                                  60                                  65

cgc cag gac ttt gcc aac atg acg ggg ctg gtg gac ctg acc ctg tcc 717  
 Arg Gln Asp Phe Ala Asn Met Thr Gly Leu Val Asp Leu Thr Leu Ser  
           70                                  75                                  80

agg aac acc atc agc cac atc cag ccc ttt tcc ttt ctg gac ctc gag 765  
 Arg Asn Thr Ile Ser His Ile Gln Pro Phe Ser Phe Leu Asp Leu Glu  
           85                                  90                                  95                                  100

agc ctc cgc tcc ctg cat ctt gac agc aat cgg ctg cca agc ctt ggg 813  
 Ser Leu Arg Ser Leu His Leu Asp Ser Asn Arg Leu Pro Ser Leu Gly  
                                   105                                  110                                  115

gag gac acc ctc cgg ggc ctg gtc aac ctg cag cac ctt atc gtg aac 861  
 Glu Asp Thr Leu Arg Gly Leu Val Asn Leu Gln His Leu Ile Val Asn  
                   120                                  125                                  130

aac aac cag ctg ggc ggc atc gca gat gag gct ttt gag gac ttc ctg 909

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Asn Asn Gln Leu Gly Gly Ile Ala Asp Glu Ala Phe Glu Asp Phe Leu  
                   135                                  140                                  145

ctg aca ttg gag gat ctg gac ctc tcc tac aac aac ctc cat ggc ctg           957  
 Leu Thr Leu Glu Asp Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu His Gly Leu  
           150                                  155                                  160

ccg tgg gac tcc gtg cga cgc atg gtc aac ctc cac cag ctg agc ctg           1005  
 Pro Trp Asp Ser Val Arg Arg Met Val Asn Leu His Gln Leu Ser Leu  
 165                                  170                                  175                                  180

gac cac aac ctg ctg gat cac atc gcc gag ggc acc ttt gca gac ctg           1053  
 Asp His Asn Leu Leu Asp His Ile Ala Glu Gly Thr Phe Ala Asp Leu  
                                   185                                  190                                  195

cag aaa ctg gcc cgc ctg gat ctc acc tcc aat cgg ctg cag aag ctg           1101  
 Gln Lys Leu Ala Arg Leu Asp Leu Thr Ser Asn Arg Leu Gln Lys Leu  
                   200                                  205                                  210

ccc cct gat ccc atc ttt gcc cgc tcc cag gct tcg gct ttg aca gcc           1149  
 Pro Pro Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ser Gln Ala Ser Ala Leu Thr Ala  
           215                                  220                                  225

aca ccc ttt gcc cca ccc ttg tcc ttt agt ttt ggg ggt aac cca ctt           1197  
 Thr Pro Phe Ala Pro Pro Leu Ser Phe Ser Phe Gly Gly Asn Pro Leu  
           230                                  235                                  240

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cac tgc aat tgt gag ctt ctc tgg ctg cgg agg ctc gag cgg gac gat 1245  
His Cys Asn Cys Glu Leu Leu Trp Leu Arg Arg Leu Glu Arg Asp Asp  
245 250 255 260

gac ctg gaa acc tgt ggc tcc cca ggg ggc ctc aag ggt cgc tac ttc 1293  
Asp Leu Glu Thr Cys Gly Ser Pro Gly Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Phe  
265 270 275

tgg cat gtg cgt gag gag gag ttt gtg tgc gag ccg cct ctc atc acc 1341  
Trp His Val Arg Glu Glu Glu Phe Val Cys Glu Pro Pro Leu Ile Thr  
280 285 290

cag cac aca cac aag ttg ctg gtt ctg gag ggc cag gcg gcc aca ctc 1389  
Gln His Thr His Lys Leu Leu Val Leu Glu Gly Gln Ala Ala Thr Leu  
295 300 305

aag tgc aaa gcc att ggg gac ccc agc ccc ctt atc cac tgg gta gcc 1437  
Lys Cys Lys Ala Ile Gly Asp Pro Ser Pro Leu Ile His Trp Val Ala  
310 315 320

ccc gat gac cgc ctg gta ggg aac tcc tca agg acc gct gtc tat gac 1485  
Pro Asp Asp Arg Leu Val Gly Asn Ser Ser Arg Thr Ala Val Tyr Asp  
325 330 335 340

aat ggc acc ctg gac atc ttc atc acc aca tct cag gac agt ggt gcc 1533

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Asn Gly Thr Leu Asp Ile Phe Ile Thr Thr Ser Gln Asp Ser Gly Ala  
345 350 355

ttc acc tgc att gct gcc aat gct gcc gga gag gcc acg gcc atg gtg 1581  
Phe Thr Cys Ile Ala Ala Asn Ala Ala Gly Glu Ala Thr Ala Met Val  
360 365 370

gag gtc tcc atc gtc cag ctg cca cac ctc agc aac agc acc agc cgc 1629  
Glu Val Ser Ile Val Gln Leu Pro His Leu Ser Asn Ser Thr Ser Arg  
375 380 385

act gca ccc ccc aag tcc cgc ctc tca gac atc act ggc tcc agc aag 1677  
Thr Ala Pro Pro Lys Ser Arg Leu Ser Asp Ile Thr Gly Ser Ser Lys  
390 395 400

acc agc cgg gga ggt gga ggc agt ggg ggc gga gag cct ccc aaa agc 1725  
Thr Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Pro Lys Ser  
405 410 415 420

ccc ccg gaa cgg gct gtg ctt gtg tct gaa gtg acc acc acc tcg gcc 1773  
Pro Pro Glu Arg Ala Val Leu Val Ser Glu Val Thr Thr Thr Ser Ala  
425 430 435

ctg gtc aag tgg tct gtc agc aag tca gca ccc cgg gtg aag atg tac 1821  
Leu Val Lys Trp Ser Val Ser Lys Ser Ala Pro Arg Val Lys Met Tyr  
440 445 450

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



cag ctg cag tac aac tgc tct gac gat gag gta ctg att tac agg atg 1869  
 Gln Leu Gln Tyr Asn Cys Ser Asp Asp Glu Val Leu Ile Tyr Arg Met  
           455                          460                          465

atc cca gcc tcc aac aag gcc ttc gtg gtc aac aac ctg gtg tca ggg 1917  
 Ile Pro Ala Ser Asn Lys Ala Phe Val Val Asn Asn Leu Val Ser Gly  
           470                          475                          480

act ggc tac gac ttg tgt gtg ctg gcc atg tgg gat gac aca gcc acg 1965  
 Thr Gly Tyr Asp Leu Cys Val Leu Ala Met Trp Asp Asp Thr Ala Thr  
 485                          490                          495                          500

aca ctc acg gcc acc aac atc gtg ggc tgc gcc cag ttc ttc acc aag 2013  
 Thr Leu Thr Ala Thr Asn Ile Val Gly Cys Ala Gln Phe Phe Thr Lys  
                           505                          510                          515

gct gac tac ccg cag tgc cag tcc atg cac agc cag att ctg ggc ggc 2061  
 Ala Asp Tyr Pro Gln Cys Gln Ser Met His Ser Gln Ile Leu Gly Gly  
                           520                          525                          530

acc atg atc ctg gtc atc ggg ggc atc atc gtg gcc acg ctg ctg gtc 2109  
 Thr Met Ile Leu Val Ile Gly Gly Ile Ile Val Ala Thr Leu Leu Val  
           535                          540                          545

ttc atc gtc atc ctc atg gtg cgc tac aag gtc tgc aac cac gag gcc 2157

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Phe Ile Val Ile Leu Met Val Arg Tyr Lys Val Cys Asn His Glu Ala  
 550 555 560

ccc agc aag atg gca gcg gcc gtg agc aat gtg tac tcg cag acc aac 2205  
 Pro Ser Lys Met Ala Ala Ala Val Ser Asn Val Tyr Ser Gln Thr Asn  
 565 570 575 580

ggc gcc cag cca ccg cct cca agc agc gca cca gcc ggg gcc ccg ccg 2253  
 Gly Ala Gln Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Pro Ala Gly Ala Pro Pro  
 585 590 595

cag ggc ccg ccg aag gtg gtg gtg cgc aac gag ctc ctg gac ttc acc 2301  
 Gln Gly Pro Pro Lys Val Val Val Arg Asn Glu Leu Leu Asp Phe Thr  
 600 605 610

gcc agc ctg gcc cgc gcc agt gac tcc tct tcc tcc agc tcc ctg ggc 2349  
 Ala Ser Leu Ala Arg Ala Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly  
 615 620 625

agt ggg gag gct gcg ggg ctg gga cgg gcc ccc tgg agg atc cca ccc 2397  
 Ser Gly Glu Ala Ala Gly Leu Gly Arg Ala Pro Trp Arg Ile Pro Pro  
 630 635 640

tcc gcc ccg cgc ccc aag ccc agc ctt gac cgc ctg atg ggg gcc ttc 2445  
 Ser Ala Pro Arg Pro Lys Pro Ser Leu Asp Arg Leu Met Gly Ala Phe  
 645 650 655 660

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

gcc tcc ctg gac ctc aag agt cag aga aag gag gag ctg ctg gac tcc 2493  
Ala Ser Leu Asp Leu Lys Ser Gln Arg Lys Glu Glu Leu Leu Asp Ser  
665 670 675

agg act cca gcc ggg aga ggg gct ggg acg tcg gcc cgg ggc cac cac 2541  
Arg Thr Pro Ala Gly Arg Gly Ala Gly Thr Ser Ala Arg Gly His His  
680 685 690

tcg gac cga gag cca ctg ctg ggg ccc cct gcg gcc cgg gcc agg agc 2589  
Ser Asp Arg Glu Pro Leu Leu Gly Pro Pro Ala Ala Arg Ala Arg Ser  
695 700 705

ctg ctc ccc ttg ccg ttg gag ggc aag gcc aaa cgc agc cac tcc ttc 2637  
Leu Leu Pro Leu Pro Leu Glu Gly Lys Ala Lys Arg Ser His Ser Phe  
710 715 720

gac atg ggg gac ttt gct gct gcg gcg gcg gga ggg gtc gtg ccg ggc 2685  
Asp Met Gly Asp Phe Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Val Pro Gly  
725 730 735 740

ggc tac agt cct cct cgg aag gtc tcg aac atc tgg acg aag cgc agc 2733  
Gly Tyr Ser Pro Pro Arg Lys Val Ser Asn Ile Trp Thr Lys Arg Ser  
745 750 755

ctc tct gtc aac ggc atg ctc ttg ccc ttt gag gag agt gac ctg gtg 2781

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Leu Ser Val Asn Gly Met Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ser Asp Leu Val  
                   760                                  765                                  770

ggg gcc cgg ggg act ttt ggc agc tcc gaa tgg gtg atg gag agc acg 2829  
 Gly Ala Arg Gly Thr Phe Gly Ser Ser Glu Trp Val Met Glu Ser Thr  
                   775                                  780                                  785

gtc taggtggggg tgggcatgct ccctttcctg tgcgcagggt gggagaaggg 2882  
 Val

gaaagaatct cactggcaag tgtttgtgga gtttccatgg tgatgtttac atccaggac 2942

agtttcgtct cctgtcaat ggcctcgtgt cccccctac cccgcaacac ccacatcacc 3002

tccccaccac ccggccgggg tgtgctcagg gaatgtggac tcgctcaaat gccggactga 3062

gccctgagtg tttggaaagg cgagactccg cttttctaat cacaaatgta gcctacaagc 3122

aagcggcttt ggattgctta tg 3144

<210> 2

<211> 789

<212> PRT

<213> Homo sapiens

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



&lt;400&gt; 2

Met Glu Thr Leu

1

Leu Gly Gly Leu Leu Ala Phe Gly Met Ala Phe Ala Val Val Asp Ala  
5 10 15 20

Cys Pro Lys Tyr Cys Val Cys Gln Asn Leu Ser Glu Ser Leu Gly Thr  
25 30 35

Leu Cys Pro Ser Lys Gly Leu Leu Phe Val Pro Pro Asp Ile Asp Arg  
40 45 50

Arg Thr Val Glu Leu Arg Leu Gly Gly Asn Phe Ile Ile His Ile Ser  
55 60 65

Arg Gln Asp Phe Ala Asn Met Thr Gly Leu Val Asp Leu Thr Leu Ser  
70 75 80

Arg Asn Thr Ile Ser His Ile Gln Pro Phe Ser Phe Leu Asp Leu Glu  
85 90 95 100

Ser Leu Arg Ser Leu His Leu Asp Ser Asn Arg Leu Pro Ser Leu Gly  
105 110 115

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Glu Asp Thr Leu Arg Gly Leu Val Asn Leu Gln His Leu Ile Val Asn

120

125

130

Asn Asn Gln Leu Gly Gly Ile Ala Asp Glu Ala Phe Glu Asp Phe Leu

135

140

145

Leu Thr Leu Glu Asp Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu His Gly Leu

150

155

160

Pro Trp Asp Ser Val Arg Arg Met Val Asn Leu His Gln Leu Ser Leu

165

170

175

180

Asp His Asn Leu Leu Asp His Ile Ala Glu Gly Thr Phe Ala Asp Leu

185

190

195

Gln Lys Leu Ala Arg Leu Asp Leu Thr Ser Asn Arg Leu Gln Lys Leu

200

205

210

Pro Pro Asp Pro Ile Phe Ala Arg Ser Gln Ala Ser Ala Leu Thr Ala

215

220

225

Thr Pro Phe Ala Pro Pro Leu Ser Phe Ser Phe Gly Gly Asn Pro Leu

230

235

240

His Cys Asn Cys Glu Leu Leu Trp Leu Arg Arg Leu Glu Arg Asp Asp

245

250

255

260

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Asp Leu Glu Thr Cys Gly Ser Pro Gly Gly Leu Lys Gly Arg Tyr Phe

265

270

275

Trp His Val Arg Glu Glu Glu Phe Val Cys Glu Pro Pro Leu Ile Thr

280

285

290

Gln His Thr His Lys Leu Leu Val Leu Glu Gly Gln Ala Ala Thr Leu

295

300

305

Lys Cys Lys Ala Ile Gly Asp Pro Ser Pro Leu Ile His Trp Val Ala

310

315

320

Pro Asp Asp Arg Leu Val Gly Asn Ser Ser Arg Thr Ala Val Tyr Asp

325

330

335

340

Asn Gly Thr Leu Asp Ile Phe Ile Thr Thr Ser Gln Asp Ser Gly Ala

345

350

355

Phe Thr Cys Ile Ala Ala Asn Ala Ala Gly Glu Ala Thr Ala Met Val

360

365

370

Glu Val Ser Ile Val Gln Leu Pro His Leu Ser Asn Ser Thr Ser Arg

375

380

385

Thr Ala Pro Pro Lys Ser Arg Leu Ser Asp Ile Thr Gly Ser Ser Lys

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

390		395		400
Thr Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Pro Lys Ser				
405		410		415
				420
Pro Pro Glu Arg Ala Val Leu Val Ser Glu Val Thr Thr Thr Ser Ala				
		425		430
				435
Leu Val Lys Trp Ser Val Ser Lys Ser Ala Pro Arg Val Lys Met Tyr				
		440		445
				450
Gln Leu Gln Tyr Asn Cys Ser Asp Asp Glu Val Leu Ile Tyr Arg Met				
		455		460
				465
Ile Pro Ala Ser Asn Lys Ala Phe Val Val Asn Asn Leu Val Ser Gly				
		470		475
				480
Thr Gly Tyr Asp Leu Cys Val Leu Ala Met Trp Asp Asp Thr Ala Thr				
485		490		495
				500
Thr Leu Thr Ala Thr Asn Ile Val Gly Cys Ala Gln Phe Phe Thr Lys				
		505		510
				515
Ala Asp Tyr Pro Gln Cys Gln Ser Met His Ser Gln Ile Leu Gly Gly				
		520		525
				530

**THIS PAGE IS BLANK (UNPTG)**



Thr Met Ile Leu Val Ile Gly Gly Ile Ile Val Ala Thr Leu Leu Val

535

540

545

Phe Ile Val Ile Leu Met Val Arg Tyr Lys Val Cys Asn His Glu Ala

550

555

560

Pro Ser Lys Met Ala Ala Ala Val Ser Asn Val Tyr Ser Gln Thr Asn

565

570

575

580

Gly Ala Gln Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Pro Ala Gly Ala Pro Pro

585

590

595

Gln Gly Pro Pro Lys Val Val Val Arg Asn Glu Leu Leu Asp Phe Thr

600

605

610

Ala Ser Leu Ala Arg Ala Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly

615

620

625

Ser Gly Glu Ala Ala Gly Leu Gly Arg Ala Pro Trp Arg Ile Pro Pro

630

635

640

Ser Ala Pro Arg Pro Lys Pro Ser Leu Asp Arg Leu Met Gly Ala Phe

645

650

655

660

Ala Ser Leu Asp Leu Lys Ser Gln Arg Lys Glu Glu Leu Leu Asp Ser

665

670

675

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Arg Thr Pro Ala Gly Arg Gly Ala Gly Thr Ser Ala Arg Gly His His

680

685

690

Ser Asp Arg Glu Pro Leu Leu Gly Pro Pro Ala Ala Arg Ala Arg Ser

695

700

705

Leu Leu Pro Leu Pro Leu Glu Gly Lys Ala Lys Arg Ser His Ser Phe

710

715

720

Asp Met Gly Asp Phe Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Val Pro Gly

725

730

735

740

Gly Tyr Ser Pro Pro Arg Lys Val Ser Asn Ile Trp Thr Lys Arg Ser

745

750

755

Leu Ser Val Asn Gly Met Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ser Asp Leu Val

760

765

770

Gly Ala Arg Gly Thr Phe Gly Ser Ser Glu Trp Val Met Glu Ser Thr

775

780

785

Val

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 3

gactagtct agatcgcgag cggccgcct tttttttt ttt

44

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized adapter sequence.

<400> 4

tcgaccacg cgtccg

16

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized adapter sequence.

<400> 5

cggacgcgtg gg

12

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 6

cagggtggga gaaggggaaa gaatc

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence.

<400> 7

gaggcattg acaggagac gaaac

25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06449

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, G01N33/53//C12P21/08, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12N1/21, G01N33/53, C12P21/08, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Adams MD et al. "Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library.", Nature Genet. (1993) Vol. 4, No. 4, p. 373-380	9/ 1-8
PX	Takahiro Nagase et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XV. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro", DNA Res. (1999) Vol. 6, No. 5, p. 337-345	1-9
A	Hualing Dong et al. "GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors", Nature (1997) Vol. 386, No. 6622, p. 279-284	1-9
A	Francis P. et al. "The Human Testis Determining Factor SPY Binds a Nuclear Factor Containing PDZ Protein Interaction Domains", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 11, p. 7167-7172	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 January, 2000 (20.01.00)

Date of mailing of the international search report  
01 February, 2000 (01.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, G01N33/53//C12P21/08, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12N1/21, G01N33/53, C12P21/08, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Adams MD et al. "Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library.", Nature Genet. (1993) Vol. 4, No. 4, p. 373-380	9/ 1-8
PX	Takahiro Nagase et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XV. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins <i>in vitro</i> ", DNA Res. (1999) Vol. 6, No. 5, p. 337-345	1-9
A	Hualing Dong et al. "GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors", Nature (1997) Vol. 386, No. 6622, p. 279-284	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.01.00

国際調査報告の発送日

01 February 2000 (01.02.00)

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一 印

4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Francis P. et al. "The Human Testis Determining Factor <i>SPY</i> Binds a Nuclear Factor Containing PDZ Protein Interaction Domains", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 11, p. 7167-7172	1 - 9